

200400228A

厚生労働科学研究費補助金

基礎研究成果の臨床応用研究事業

「虚血性疾患に対する血管内皮前駆細胞移植の基礎・臨床応用」

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 浅原 孝之

平成17(2005)年3月

目 次

I. 総括研究報告書	
血管内皮前駆細胞トランスレーショナルリサーチに関する研究 浅原 孝之（先端医療振興財団 再生医療研究部）	1
II. 分担研究報告	
1. 血管内皮前駆細胞トランスレーショナルリサーチに関する研究 浅原 孝之（先端医療振興財団 再生医療研究部）	5
2. 次世代の血管内皮前駆細胞を用いた遺伝子治療法の開発 に関する研究 岩畔 英樹（東海大学医学部 再生医学センター）	7
3. 無血清培養下にて体外増幅した血管内皮前駆細胞移植療法 の確率に関する研究 増田 治史（東海大学医学部 再生医学センター）	9
4. 血管内皮前駆細胞分化動態に関する研究 村澤 聡（先端医療振興財団 再生医療研究部）	11
5. 血管内皮前駆細胞による血管再生治療の成否に関わる 因子の検討に関する研究 西村 浩美（先端医療振興財団 再生医療研究部）	13
6. 虚血性疾患患者に対する自家血管内皮前駆細胞移植 による血管再生治療に関する研究 川本 篤彦（先端医療振興財団 再生医療研究部）	15
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	19
IV. 研究成果の刊行物・別刷	21

I 総括研究報告書

総括研究報告書

血管内皮前駆細胞トランスレーショナルリサーチ総括

主任研究者 浅原孝之 先端医療振興財団 再生医療研究部長

研究要旨 慢性虚血性心疾患患者および下肢閉塞性動脈硬化症患者に対する、自己血管内皮前駆細胞(EPC)移植治療法の開発を進めている。G-CSF の投与により血管内皮前駆細胞を骨髓から末梢血へ強制動員した後に、apheresis により単核球分画を採取し、CD34 陽性細胞を EPC として分離し、虚血部位に局所移植する治療が検討されている。本年度は、EPC の細胞活性の評価・改変、および移植技術の開発、下肢虚血性疾患の臨床研究、および虚血性心疾患を対象とした再生治療の臨床プロトコール作製を進めた。

分担者名

浅原 孝之 先端医療振興財団
再生医療研究部長
川本 篤彦 先端医療振興財団
主任研究員
増田 治史 東海大学医学部
再生医学センター 研究主任
村澤 聡 先端医療振興財団
主任研究員
西村 浩美 先端医療振興財団
主任研究員
岩畔 英樹 東海大学医学部
再生医学センター 研究員

A. 研究目的

これまでの研究で細胞移植法では十分な臨床効果を得るための細胞準備・移植方法が検討されていなかった。

そこで、以下の項目について検討がなされた。

1. EPCの細胞活性の評価。
2. EPCの細胞活性の改変。
3. EPC移植法の開発。
4. 下肢虚血性疾患の臨床治療
5. 虚血性心疾患治療のプロトコール作製

B. 研究方法

岩畔は、EPC の生体治療能力を高めるための、細胞の遺伝子改変と細胞制御方法について研究を進めた。村澤は、臨床患者の EPC の細胞活性を研究し、適切な治療細胞群の同定を進めた。西村は、移植細胞群の分布を科学的に捕らえることで、適切な治療細胞群の同定を研究した。川本は、下肢虚血性疾患治療の臨床研究を進め、虚血性心疾患への再生治療の臨床研究プロトコールの作製にも務めた。浅原は、各開発技術が臨床応用出来るよう、研究全体を把握し改善することで、前臨床研究を実際の臨床研究に結びつける最終検討を重ねた。

（倫理面への配慮）

上記の臨床試験は、先端医療センター再生医療審査委員会・神戸市立中央市民病院倫理委員会から実施の承認を得た後に、被験者から同意を得て開始される。

C. 研究結果

EPC は、各種方法で有意に同定・採取され、その細胞学的活性が確認された。下肢虚血性疾

患の EPC は細胞生物学的に十分な活性が残されている事が判明した。単細胞 PCR では、EPC 細胞分布も確認できるようになってきたため今後の臨床応用が期待される。下肢虚血性疾患患者への CD34 陽性細胞移植の臨床研究は、計 8 例を終了し、順調な経過をたどっている。虚血心疾患患者への CD34 陽性細胞移植の臨床研究は、臨床プロトコールを完成させ、現在直前の準備に取りかかっている。

D. 考察

臨床治療に必要な EPC の数を確保することは困難であり、効率良く質の高い EPC を採取することが必須となってくる。これまでの検討で、G-CSF で EPC の動員が有意に促進された。この結果を、上記診断治療カテーテルによる細胞移植と組み合わせ、精密で効果的な治療効果を得る技術の確立出来るめどがたった。

実際に臨床研究が開始され、そのフィードバックを受けたさらなるトランスレーショナルリサーチが期待される。

E. 結論

EPC の生体内・生体外増幅が可能である。カテーテルによる心筋虚血部位への細胞移植方法は、安全かつ効果的に治療出来ることが判明した。

F. 健康危険情報

ヒトへの応用に関して、臨床で応用出来るという安全性も確認され、初期治療が開始されている。

G. 研究発表

1. 論文発表

- Kawamoto A, Asahara T, Losordo DW. Transplantation of endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Handbook of Cardiovascular Cell Translation*. 2004; 3:31-41.
- Asahara. T, Kawamoto. A. Endothelial Progenitor

Cells for Postnatal Vasculogenesis. *AJP:Cell Physiology*. 2004 Sep;287(3):C572-9.

Ishikawa M, Asahara T. Endothelial Progenitor Cell Culture for Vascular Regeneration. *Stem Cells and Development*. 2004 Aug;13(4):344-9.

Masaaki Ii, Hiromi Nishimura, Atsushi Iwakura, Andrea Wecker, Elizabeth Eaton, Takayuki Asahara & Douglas W. Losordo. Endothelial progenitor cells are rapidly recruited to myocardium and mediate protective effect of ischemic preconditioning via "imported" nitric oxide synthase activity. *Circ*. 2004 (in press).

2. 学会発表

2004.3 第 68 回日本循環器学会総会・学術集会 "Angiogenesis and Regeneration Medicine in Cardiovascular Medicine"

2004.4 第 104 回日本外科学会定期学術総会 "幹細胞生物学の血管医学への応用"

2004.4 Cardiovascular Cell and Gene Therapy Conference II, MA, "Endothelial progenitor cells for vascular medicine"

2004.4 Angioplasty Summit 2004, Korea, "The Therapeutic Potential of Stimulated Endothelial Progenitor"

2004.5 Vascular Biology Meeting, Germany "Stem cells growth factors and angiogenesis future treatment strategies"

2004.6 XIIIth International Vascular Biology Meeting, Toronto "Vascular stem cell transdifferentiation"

2004.8 XVIII World Congress International Society for Heart Research, Brisbane "Stem cell biology for vascular regeneration"

2004.9 Twelfth pulmonary circulation

conference, Colorado

“Circulating Endothelial Cells in
Vascular Repair”

2004.10 Basic Concepts and Innovative
Strategies in Heart Disease, Capri

“Endothelial progenitor cell biology
and therapeutic regeneration”

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）
今年度は予定無し

Ⅱ 分担研究報告書

分担研究報告書

血管内皮前駆細胞トランスレーショナルリサーチ

分担研究者 浅原孝之

研究要旨 慢性虚血性心疾患患者および下肢閉塞性動脈硬化症患者に対する、自己血管内皮前駆細胞(EPC)移植治療法の開発を進めている。G-CSFの投与により血管内皮前駆細胞を骨髄から末梢血へ強制動員した後に、apheresisにより単核球分画を採取し、CD34陽性細胞を血管内皮前駆細胞として分離し、虚血部位に局所移植する治療が検討されている。今年度はカテーテルを用いた細胞移植法に関する基礎研究および臨床研究プロトコールの開発が進められた。

A. 研究目的

従来、幹・前駆細胞移植法では十分な臨床効果を得るための細胞の移植場所を同定することが困難であった。細胞移植法の移植部位組織の精密な検討と共に、特殊診断治療カテーテルを用いた細胞移植法に関する基礎・応用研究を目的とした。また、実際の臨床研究プロトコールの開発が計画された。

B. 研究方法

血管内皮前駆細胞(EPC)の心筋内局所移植により、組織の変化を確認した。さらにカテーテルの位置、接触組織の生体反応と壁運動をセンサーで同定し、実際の虚血部位を診断する装置(NOGA system)を豚の心筋梗塞モデルに用いた。虚血部位と診断された箇所、カテーテル先端から細胞移植用の針が挿入され、用意した血管内皮前駆細胞EPCを移植した。血管内皮前駆細胞は、心筋梗塞病巣が確立後4週目に、自己血液から採取され、病巣に移植され、4週間後に機能検査・組織検査など施行された。臨床計画のためのプロトコール開発では、神戸に設立されたトランスレーショナルリサーチインフォーマティクスセンター(TRI)での検討によるプロトコール作成が進められた。

(倫理面への配慮)

上記の臨床研究プロトコールは、先端医療センター再生医療審査委員会・神戸市立中央市民病院倫理委員会から実施の承認を得た後に、被験者から同意を得て開始される。

C. 研究結果

動物実験の結果、安全に細胞は心筋に移植され、虚血心筋内の血管形成は著名に促進された。虚血心臓の機能回復も細胞治療を受けた群だけが著名に改善を遂げた。血管の再生と共に、心筋再生も確認できた。エンドポイントに関する検討も含め、臨床研究プロトコールが作成され、臨床研究に活用された。

D. 考察

臨床治療に必要なEPCの数を確保することは困難であり、効率良くEPCを採取することが必須となってくる。これまでの検討で、G-CSFでEPCの動員が有意に促進された。この結果を、上記診断治療カテーテルによる細胞移植と組み合わせ、精密で効果的な治療効果を得る技術の確立出来るめどがたつたと考えられる。

臨床研究プロトコールの開発は、臨床研究からのトランスレーショナルリサーチへのフィードバックを反映させるためにも、不可欠のものであると考える。

E. 結論

カテーテルによる心筋虚血部位への細胞移植方法は、安全かつ効果的に治療出来ることが判明した。臨床研究プロトコールの綿密性は、臨床研究からのトランスレーショナルリサーチへのフィードバックに反映される。

F. 健康危険情報

ヒトへの応用に関して、本カテーテルはすでに

臨床で使用されているので安全性については確認されている。

G. 研究発表

[1. 論文発表]

- Kawamoto A, Asahara T, Losordo DW. Transplantation of endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Handbook of Cardiovascular Cell Translation*. 2004; 3:31-41.
- Asahara. T, Kawamoto. A. Endothelial Progenitor Cells for Postnatal Vasculogenesis. *AJP:Cell Physiology*. 2004 Sep;287(3):C572-9.
- Ishikawa M, Asahara T. Endothelial Progenitor Cell Culture for Vascular Regeneration. *Stem Cells and Development*. 2004 Aug;13(4):344-9.
- Masaaki Ii, Hiromi Nishimura, Atsushi Iwakura, Andrea Wecker, Elizabeth Eaton, Takayuki Asahara & Douglas W. Losordo. Endothelial progenitor cells are rapidly recruited to myocardium and mediate protective effect of ischemic preconditioning via “imported” nitric oxide synthase activity. *Circ*. 2004 (in press).

2. 学会発表

- 2004.3 第68回日本循環器学会総会・学術集会 “Angiogenesis and Regeneration Medicine in Cardiovascular Medicine”
- 2004.4 第104回日本外科学会定期学術総会 “幹細胞生物学の血管医学への応用”
- 2004.4 Cardiovascular Cell an Gene Therapy Conference II, MA, “Endothelial progenitor cells for vascular medicine”
- 2004.4 Angioplasty Summit 2004, Korea, “The Therapeutic Potential of Stimulated Endothelial Progenitor”
- 2004.5 Vascular Biology Meeting, Germany “Stem cells growth factors and angiogenesis future treatment strategies”
- 2004.6 XIIIth International Vascular Biology Meeting, Toronto “Vascular stem cell transdifferentiation”
- 2004.8 XVIII World Congress International Society for Heart Research, Brisbane “Stem cell biology for vascular regeneration”
- 2004.9 Twelfth pulmonary circulation conference, Colorado “Circulating Endothelial Cells in Vascular Repair”
- 2004.10 Basic Concepts and Innovative Strategies in Heart Disease, Capri “Endothelial progenitor cell biology and therapeutic regeneration”

H. 知的財産権の出願・登録状況

今年度は予定なし。

分担研究報告書

次世代の血管内皮前駆細胞を用いた遺伝子治療法の開発

分担研究者 岩畔 英樹 東海大学医学部再生医学センター 助手

研究要旨：

次世代における血管内皮前駆細胞(EPCs)を用いた移植治療の新たな応用法として、Hif1-alphaの血管新生性遺伝子導入した血管内皮前駆細胞移植療法 of 虚血性疾患に対する治療有効性を再検討し、更にメカニズムについて検討した。

A. 研究目的

虚血性疾患における自己血由来 EPC 移植療法 of 開発において、血管新生促進遺伝子導入 EPC 移植療法 of 開発が望まれる。前年度、hypoxia inducible factor1-alpha(Hif1-alpha)の遺伝子導入 EPC 療法 of 有効性を示したが、今回は更に、その細胞分子レベルでのメカニズムについて検討した。

B. 研究方法

成人末梢血から分離採取した血管内皮前駆細胞(EPCs)を材料とし、以下の実験を行った。EPCs は、末梢血から分離し、培養7日目にアデノウイルスベクターを用いて、治療群として HIF-1 α 遺伝子(Ad/ HIF-1 α)、コントロール群として b-galactosidase 遺伝子(Ad/ β -gal)を遺伝子導入した。

1) 遺伝子導入後の細胞活性及び細胞死の解析
HIF-1 α 遺伝子導入後 EPC を、0.5 (%)アルブミン添加したEBM-2培養液下で2日間培養した後、DAPI染色を用いて、細胞核染色を行いアポトーシス(細胞死)の解析を行った。

2) 遺伝子導入後細胞の接着能解析
HUVEC(ヒト臍帯静脈内皮細胞) Monolayer を用いて、生体と同じ環境下における遺伝子導入後の細胞接着能を解析した。

3) 表面マーカーによる細胞形態変化の観察
FACS analysis を用いて、遺伝子導入後の EPC に対し血管内皮特異的なマーカーの発現率の測定及び、細胞形態変化の解析を行った。

(倫理面への配慮)

末梢血はボランティアに十分なインフォームドコンセントを施し採血した。また、動物実験は東海大学医学部動物倫理委員会の承認を

得て、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針及び動物愛護に基づき施行した。

C. 研究結果

Hif1-alpha 遺伝子導入 EPCs の細胞死の発生頻度はコントロール遺伝子導入 EPCs に比し有意に減少していた。また、HUVEC を用いた接着能の解析では、Hif1-alpha 遺伝子導入 EPC 移植群において有意に接着数の増加が認められた。FACS によるマーカー解析では、接着系因子(インデグリン、セレクチン)の陽性率の増加が認められた。

D. 考察

Hif1-alpha 遺伝子導入 EPC 移植による機能的な新生血管、血流の改善には、細胞分子レベルでの接着能の関与が非常に影響を及ぼしていると考えられた。

E. 結論

血管新生促進遺伝子導入による EPC 移植療法を開発する上で、今後は更にメカニズムの解明を進めて行く予定である。

F. 健康危険情報

現時点では特に問題は無いが、更に検討を行う。

G. 研究発表

1. 出版：

Iwaguro, H, and Asahara, T.
Cardiovascular Regeneration Therapies Using
Tissue Engineering Approaches
2004 November 15

2. 発表：

Iwaguro, H, Nakazawa, I, Ishikawa, T, Sugimoto, A,
Tono, K, Yoshida, M, Iwami, Y, Eguchi, M, Onodera, N,
Masuda, H, and Asahara, T.
Mechanism of hypoxic inducible pathway for
vascular regeneration

(第81回日本生理学会)

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特記事項なし

厚生労働科学研究費補助金分担研究報告書
厚生労働科学研究費補助金 (基礎研究成果の臨床応用推進研究事業)
(総括(分担)研究報告書)

無血清培養下にて体外増幅した血管内皮前駆細胞移植療法に関する研究
(主任又は分担)研究者 増田治史 東海大学医学部

研究要旨 虚血性疾患患者を対象とした血管内皮前駆細胞(EPC)による移植療法において、自己EPCを抹消血から採取後、患部に移植する治療法が開発され、臨床応用されているが、採取EPCの質/量には限界がある。今回、臍帯血より分離した未分化EPC(CD133陽性細胞)の無血清培養条件下の成体外増幅法を確立し、その移植療法の有効性を証明した。

A. 研究目的;

虚血性疾患患者を対象とした血管内皮前駆細胞(EPC)による移植療法において、自己EPCを抹消血から採取後、患部に移植する治療法が開発され臨床応用されているが、採取EPCの質/量には限界がある。そこで、未分化EPCの無血清培養条件下成体外増幅法を確立し、その移植療法の開発を行うことを目的とした。

B. 研究方法

ヒト臍帯血単核球採取し、抗体ビーズ法を用いて、CD133陽性細胞(未分化EPC)を単離。CD133陽性細胞をhFlt-3, hVEGF, hSCF, hTPO, hIL-6, TGFbeta inhibitor 添加無血清培地を用いて2週間培養した。増幅された細胞を培養前、1、2週後の各time pointにて血液系前駆細胞及びEPCの各コロニーアッセイにて、増幅細胞の質的評価(EPCコロニー産生能向上、血液系コロニー産生低下を期待)を行った。増幅細胞を心筋梗塞を作成したラット虚血心筋内に同日移植し(1x10⁵/rat, 5x10⁵/rat)、移植4週目において、心臓超音波及びカテーテルによる圧測定を行ない心機能を評価した。

(倫理面への配慮)

東海大学における「医の倫理委員会」「臍帯血バンク」「動物実験委員会」の承認を得た。

C. 研究結果

培養1週間目77.3±9.78倍、2週間目696.2±163.0倍の細胞数の増加が認められた。EPCコロニーアッセイにおいて総血液系コロニー産生能(%=d7 or d14 colony数/d0 colony数)は、培養前に比較して1週間目33.6%、2週間目29.7%にまで低下し、一方で各時点でのEPCコロニー産生能(%=EPC colony数/総colony数)は、全出現コロニー培養前20.8±3.73%、1週間目45.7±3.85%、2週間目68.3±5.85%と増加した。in vivo移植実験において、移植後4週目のecho心機能評価にて、control, 1x10⁵/rat, 5x10⁵/ratの各群において、収縮期駆出率EF=control; 36.6±4.31%, 1x10⁵/rat;*53.61±3.4%, 5x10⁵/rat;*66.8±4.31%, (*p<0.05)と心機能の改善

が認められた(図1)。

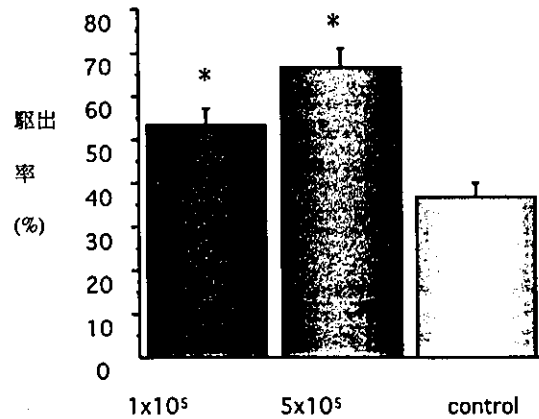


図1; 移植細胞療法後ラット虚血心筋における左室収縮能の評価

D. 考察及び結論

臍帯血由来EPCの無血清培養による分化/増幅法及び本培養法により分化/増幅した細胞の機能評価法(EPCコロニーアッセイ)を確立した。また、この技術により得た移植細胞の虚血性心疾患に対する有効性が示された。本研究により確立された技術は、新しいEPC移植療法として臨床において非常に有意義なものになると考えられた。

E. 研究発表

1. 論文発表

1) Iwami Y, Masuda H, Asahara T. Endothelial progenitor cells: past, state of the art, and future. J Cell Mol Med. 2004 Oct-Dec;8(4):488-97.

2) Masuda H, Asahara T. Post-natal endothelial progenitor cells for neovascularization in tissue regeneration. Cardiovasc Res. 2003 May 1;58(2):390-8.

3) Yamaguchi J, Masuda H, Asahara T et al. Stromal cell-derived factor-1 effects on ex vivo expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic neovascularization.

2. 学会発表

1) 第 69 回日本循環器学会発表予定
(2005. 3. 21)

2) the XXXV INTERNATIONAL CONGRESS OF
PHYSIOLOGICAL SCIENCES
(2005. 4. 6)

F. 知的財産権の出願・登録状況

実用新案登録予定(2005. 2 月中申請予定)

分担研究報告書

血管内皮前駆細胞分化動態に関する研究

分担研究者 村澤 聡

先端医療振興財団 主任研究員

研究要旨

下肢閉塞性動脈硬化症あるいはバージャー病患者に対して、G-CSF の投与により血管内皮前駆細胞を骨髄から末梢血へ強制動員した後に、apheresis により単核球分画を採取し、CD34 陽性細胞を血管内皮前駆細胞(EPC)として分離し、虚血部位に局所移植する治療が開始され、治療効果が認められている。今年度は、移植に用いられる CD34 陽性細胞の細胞機能に関して細胞生物学的検討を行った。

A. 研究目的

下肢閉塞性動脈硬化症あるいはバージャー病患者に対して用いられる血管内皮前駆細胞(CD34陽性細胞)は自己末梢血から調整されるが、患者の年齢、病態(バージャー病か動脈硬化性か)、またG-CSFの使用によって、個々の細胞機能には相違が認められ治療効果にも影響があるものと推測される。そこでin vitroにおける細胞機能のアッセイにより検討し治療に反映する事が目的である。

B. 研究方法

初年度の研究でも検討したように、細胞老化(senescence)に関連のあるテロメアに関連して、TERTのmRNAの発現、Telomerase activityを個々のCD34陽性細胞について検討した。また、細胞機能について、細胞走化性アッセイを行った。

(倫理面への配慮)

これらの細胞を用いた研究は、公的機関 私的機関(先端医療センター倫理委員会)での承認を

得た上で行われている。

C. 研究結果

研究の結果、バージャー病患者由来 CD34 陽性細胞の TERT 発現、Telomerase activity は閉塞性動脈硬化症患者由来のものより、いずれも高値を示した。走化性に関しては、両者に有意差は認めなかった。

D. 考察

今回、TERT mRNAやTelomerase activityのデータによりバージャー病と閉塞性動脈硬化症のあいだに相違が認められたが、年齢や、性別の要因も考慮する必要がある。細胞走化性に関しては、凍結細胞を用いるためアッセイ系の再検討が必要である。治療効果との相関については、今後その他のアッセイも取り入れ総合的に判断する必要があると考えられる。

E. 結論

閉塞性動脈硬化症由来 CD34 陽性細胞は、バージャー病由来 CD34 陽性細胞に比べ、細胞老化

(senescence)が進行している可能性がある。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Murasawa S, Asahara T

Endothelial Progenitor Cells for Vasculogenesis

Physiology, 20: 36-42, 2005

2. Yamaguchi J, Kusano K, Masuo O, Kawamoto A,

Silver M, Murasawa S, et al.

Stromal cell-derived factor-1 effects on ex vivo expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic neovascularization

Circulation, 107(9): 1322-8, 2003

3. 村澤 駿、浅原 孝之

(連載：遺伝子 再生医学講座)

2003年における遺伝子 再生医学研究

Angiology Frontier, vol.3 no.1, 53-56, 2004.

2. 学会発表

第45回日本脈管学会総会にて若手研究奨励賞(YIA)-基礎部門優秀賞受賞----受賞講演(北海道、ロイトン札幌) 2004. 10月

心血管幹細胞研究会にて発表(東京、都市センタービル) 2004. 7月

H. 知的財産権の出願・登録状況

今年度は予定なし。

分担研究報告書

血管内皮前駆細胞による血管再生治療の成否に関わる因子の検討

分担研究者 西村 浩美 先端医療振興財団 主任研究員

研究要旨 血管内皮前駆細胞（EPC）については血管再生への利用を含め多くの臨床応用の可能性が検討されている。我々の施設においては下肢虚血患者に対して顆粒球増殖因子（G-CSF）を5日間投与し、骨髓より末梢血に動員された CD34 陽性細胞（EPC）を用いた治療を開始し、良好な成績が得られている。しかしながら、投与された CD34 陽性細胞の体外での増殖やその性質等については十分に解明されていない。本研究では、臨床投与された細胞の一部を用い、表面抗原発現を解析し、個別の細胞の動態と遺伝子発現を組み合わせることで検討することにより、より血管再生に適した EPC の subpopulation を同定するためのシステム確立とその同定に関する検討を行った。

A. 研究目的

細胞一個単位で、EPC の動態と遺伝子発現を組み合わせることで検討し、より血管再生に適した EPC の subpopulation を同定するためのシステム確立とその同定。

B. 研究方法

FACS system と Single cell PCR system と Time-laps system を用いた細胞の cell characteristics の解明と血管内皮前駆細胞への分化誘導法の確立および血管再生能との相関を検討する。

（倫理面への配慮）

細胞治療に関わる基礎研究として、倫理面では先端医療センター倫理委員会での研究計画の承認を得たうえで、研究は実施されている。

C. 研究結果

本年度においては昨年度までに確立した system を利用して、下肢虚血患者3名において G-CSF により動員された自己末梢血 EPC（CD34 陽性細胞）を解析した。磁気ビーズ法による CD34 陽性細胞の純化率はいずれの場合も 99%以上であった。これらの細胞においては AC133, c-kit 発現は見られたが、Tie-1, Tie-2, KDR, VE-cadherin の発現は見られず、比較的未分化な endothelial lineage または血球系幹細胞と同等の性質を示すことが明らかとなった。これらの細胞に対応すると考えられる臍帯血中の AC133/CD34 陽性細胞を純化したのち、増殖させると AC133/CD34 の陽性率は共に 30%程度にまで低下する。増殖前後における、血管再性能に関する vivo assay の結果は現在解析中である。

D. 考察

今回、解析を行った3検体はいずれも治療に対しよく反応し、血管再構築が順調に経過

した患者からのCD34陽性細胞であったため、Key Factor の同定はなしであった。今後、臨床的に血管再生が十分にできなかった患者からの CD34 陽性細胞の解析結果との比較により、更に安全かつ効果的な血管再生を臨床現場において実施するための有用な知見が明らかとなると考えられる

E. 結論

下肢虚血患者における、G-CSF 動員末梢血 CD34 陽性細胞の動態と遺伝子発現を行った。更に血管再生に適した EPC の subpopulation を同定するためのシステムを確立した。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ii M, Nishimura H, Iwakura A, Wecker A, Eaton E, Asahara T, Losordo DW. Endothelial progenitor cells are rapidly recruited to myocardium and mediate protective effect of ischemic preconditioning via “imported” nitric oxide synthase activity. *Circulation*. 2004;in press

2004;in press

2. Ii M, Nishimura H, Kusano K, Qin G, Yoon Y, Wecker A, Asahara T, Losordo DW. Neuronal nitric oxide synthase mediates statin-induced restoration of vasa nervorum and reversal of diabetic neuropathy. *Circulation*. 2004; submitted

3. Nishimura H, Asahara T. Bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascular formation. *EXS*. 2005;(94):147-54.

2. 学会発表

小児循環器病研究会
再生医療における血管新生療法の現状と課題（招待講演：2004.11.13）

H. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特記事項なし

分担研究報告書

虚血性疾患患者に対する自家血管内皮前駆細胞移植による血管再生治療

分担研究者 川本 篤彦 先端医療振興財団 主任研究員

研究要旨

重症慢性下肢虚血および虚血性心疾患患者を対象にした、自家血管内皮前駆細胞移植による血管再生治療に関する第 I・II 相臨床試験を計画した。下肢虚血に対する試験計画は、先端医療センター・神戸市立中央市民病院の倫理委員会で実施の承認を得て、2003 年 11 月から移植治療が開始されている。現時点で重篤な有害事象は発生せず、自他覚所見の改善が得られている。虚血性心疾患患者に対する臨床試験も 2005 年春の開始を目指して準備を進めている。

A. 研究目的

重症慢性下肢虚血、虚血性心疾患患者に対する自家血管内皮前駆細胞（CD34 陽性細胞）移植の臨床的有用性を明らかにする。

B. 研究方法

上記の細胞移植治療に関する第 I・II 相試験を計画し、施行する。科学的に臨床試験を施行するため、独立したデータセンター、登録センターと共同で研究を進める。

（倫理面への配慮）

上記の臨床試験は、先端医療センター再生医療審査委員会・神戸市立中央市民病院倫理委員会から実施の承認を得た後に、被験者から同意を得て開始される。

C. 研究結果

重症慢性下肢虚血患者に対する上記臨床試験は、上記の手続きを経て、昨年 11 月に開始された。顆粒球コロニー刺激因子製剤の投与によ

り末梢血に動員された骨髄単核球細胞をアフエレーシスで採取し、磁気細胞分離により単核球から分離された血管内皮前駆細胞（CD34 陽性細胞）を虚血下肢の筋肉内に移植している。現在までに 8 例の患者に対する移植が安全に行われ、自他覚所見の著明な改善が得られている。虚血性心疾患に対する臨床試験も 2005 年春の開始を目指して現在準備中である。

D. 考察

臨床試験の開始に先立って、豊富な基礎研究データの準備が重要であることは言うまでもないが、患者の倫理面に配慮し、移植治療を安全かつ有効に施行するためには、綿密に臨床試験を計画し、詳細な臨床試験プロトコルを作成することが重要である。今回、GCP 規準臨床試験に準拠したプロトコルを作成することにより、臨床試験を安全にかつ科学的で、再現性の期待できる形で開始することができた。

E. 結論

重症慢性下肢虚血患者に対する自家血管内皮前駆細胞 (CD34 陽性細胞) 移植に関する第 I・II 相臨床試験を開始した。虚血性心疾患に対する同様の臨床試験も現在最終準備中である。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Kawamoto A, Murayama T, Kusano K, Ii M, Tkebuchava T, Shintani S, Iwakura A, Johnson I, von Samson P, Hanley A, Gavin M, Curry C, Silver M, Ma H, Kearney M, Losordo DW. Synergistic effect of bone marrow mobilization and vascular endothelial growth factor-2 gene therapy in myocardial ischemia. *Circulation*. 2004;110(11):1398-405.

Weber A, Pedrosa I, Kawamoto A, Himes N, Munasinghe J, Asahara T, Rofsky NM, Losordo DW. Magnetic resonance mapping of transplanted endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization in ischemic heart disease. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2004;26(1):137-43.

Asahara T, Kawamoto A. Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2004;287(3):C572-9.

川本 篤彦、浅原 孝之。血管内皮前駆細胞を用いた血管再生。 *WeIVAS*. 2005;11:8-9.

松本 知之、川本 篤彦、浅原 孝之。血管内皮前駆細胞を用いた血管再生。 *血管医学*. 2004;5(6):539-546.

川本 篤彦。血管再生治療。 *検査と技術*. 2004;32(12):1417-1419.

川本 篤彦。血管内皮前駆細胞移植による血管再生療法。 *山梨医学*. 2004;32:9-12.

岩崎 弘登、川本 篤彦、浅原 孝之。血管内皮前駆細胞を用いた血管再生療法。 *脈管学*. 2004;44(4):139-44.

川本篤彦、浅原孝之。トランスレーショナル・リサーチ入門 Chapter 3-2 神戸先端医療センター。 *Bioベンチャー*. 2004;4(3): 70-71.

川本 篤彦。虚血性疾患と血管内皮前駆細胞。 *医学のあゆみ*. 2004;208(7): 603-606.

2. 学会発表

川本 篤彦、片山 美奈子、半田 宣弘、木下 愼、白鳥 健一、小田 英世、小野寺 理恵、村澤 聡、岡田 行功、盛岡 茂文、福島 雅典、浅原 孝之
第 52 回日本心臓病学会学術集会 パネルディスカッション 3

末梢動脈疾患の治療戦略：薬物・血管内治療・外科治療・再生医療

自家血管内皮前駆細胞移植による慢性重症下肢虚血患者に対する血管再生治療

2004 年 9 月 13 日、京都

J. Cardiol. 2004;44 Suppl I:116.

Kawamoto A.

Basic and Clinical Experiences of Endothelial Progenitor Cell (EPC) Transplantation in Ischemic Cardiomyopathy and Limb Ischemia.